



研究ノート

蛋白質分子のトリプトファン 残基の働きを探る

崎 山 文 夫*

私たち人類をはじめ地球上に存在する生物の生命活動に必須の物質として、水、蛋白質、核酸がある。たとえば、大腸菌の体重の70%が水であり、蛋白質は15%、核酸は7%と見積られている。これら3種の物質のうち、水は高等動物のヒトから下等生物の大腸菌まですべて同じ H_2O という分子式で表わされる物質として存在しているが、蛋白質と核酸は、生体高分子としてそれぞれ独自の構造と機能を持つ物質の総称であり、たとえ同一の機能を持つ蛋白質や核酸でも生物種が違ふとその構造も違ふのが普通である。つまり、蛋白質と核酸は、普遍性のある水とは異なり、それぞれの生物を種として特長づける基本物質として重要なのである。

地球上に生存する生物の持つ蛋白質の分子種は約1000億種にのぼり、同じ機能を持つものをまとめても10万種になると推定されている。ヒトでは少なくとも3万種の蛋白質があり、大腸菌でも1千種あるといわれる。このように、一つの生物をとっても蛋白質の種類は膨大な数にのぼり、それぞれの蛋白質が特定の生物学的機能を持っていると考えられるので、この生体高分子は生体内で実に多様な働きを行っていることを示している。私たちの身体を見ても、頭の先の毛髪から皮膚や筋肉をはじめ、血液中の赤色のヘモグロビンや血液凝固物質、口や胃腸で食物を消化分解したり、体内で蛋白質や核酸の合成反応を触媒する酵素類もすべて蛋白質である。このように多彩な働きをする蛋白質も、その主要構成成分を調べてみると、どの蛋白質も僅か20余種のL系の α -アミノ酸 ($NH_2-CHR-COOH$) から出来ているにすぎない。蛋白質は、これらのアミノ酸が数十個から数百個ペ

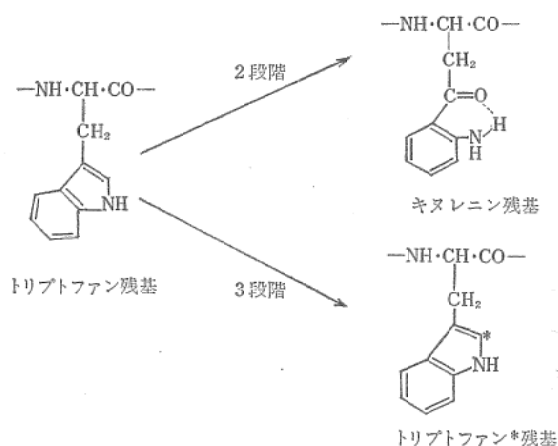
チド結合で結ばれてできたものであるが、蛋白質に含まれるアミノ酸の種類とそれらの結合順序にしたがって種々の生物学的機能を有しているわけである。アミノ酸の特長は、アミノ (NH_2) 基とカルボキシル ($COOH$) 基が共通であるため側鎖といわれるR部分の性質によって決められるが、個々の蛋白質の機能は、三次元的な広がりを持つ蛋白質分子上に組立てられた側鎖の秩序ある集団によって支えられている。いいかえると、蛋白質の機能は、個々の機能について別謎の機構に支えられていると考えるよりは、基本となるいくつかの機能素子が目的に応じて組合わせられていると考えるのが合理的であろう。このような考え方の妥当性は、数多くの蛋白質分子のX線結晶解析により支持されており、たとえば、加水分解酵素とデヒドロゲナーゼのように触媒する反応の種類が異なっているにもかかわらず、円滑なプロトンの移動が要求される場合には、それらの酵素の活性部位(触媒作用を営む部位)には側鎖にイミダゾール核を持つヒスチジン残基が存在することなどから明らかであろう。結局、蛋白質の機能の発現機構を明らかにするためには、蛋白質分子に存在する個々のアミノ酸残基の役割を系統的に理解することが重要である。私たちは、蛋白質の機能発現に関与することがしばしば報ぜられながら、その役割が明らかでない側鎖にインドール核を持つトリプトファンに注目し、研究対象として取りあげた。

トリプトファンは、アミノ酸としては、ヒトが自分の体内で合成できないため食物として摂取しなければならない8種の必須アミノ酸の一つであるほか、蛋白質の構成アミノ酸としての含有量が著しく少ないアミノ酸である。存在量の多寡のみから重要性を判断するのは適当でないかも知れないが、諸々の状況証拠は、このア

* 崎山文夫 (Fumio SAKIYAMA), 大阪大学, 蛋白質研究所, 蛋白質化学構造部門, 助教授, 理学博士, 生物化学, 蛋白質化学

ミノ酸が蛋白質を構成する物質として重要であることを示唆していると思われる。トリプトファンの特長は、側鎖のインドール核に起因するが、インドール核は後で示すように6員環のベンゼン環と5員環のピロール環が結合した平面構造をしており、20余種のアミノ酸の中では最もかさ高い側鎖である。この側鎖は、また、水素結合の供与基として溶媒の水分子など相互作用できるNH基が一つ存在するとはいえ、他の骨格原子はすべて炭化水素からできているため疎水的性質が強く、電子豊富な複素環である。

私たちが用いている主な研究方法は、蛋白質に適当な化学試薬を反応させてトリプトファンの側鎖のインドール核の構造や性質を変化させ（化学修飾という）、その変化と蛋白質の機能変化を相関づけて解析していく方法であるが、原理的には、蛋白質の機能変化を構造変化の関数として表わそうとするものである。しかし、蛋白質、とくに水に溶けている球状の蛋白質はデリケートな性質を持っており、少し過酷な条件に曝されると分子の形や性質が変化する。そのため、蛋白質分子の中のトリプトファン残基の側鎖の構造や性質だけを思い通りに変化させるのは容易ではない。私たちは、まず、研究目的に適した方法論から改めて検討し直し、次の2つの方法を考案し確立した。敢えて2つの方法を求めたのは、異なる原理に立脚した2通りの攻め方は、一方的な攻めによる片寄った見方に陥ることを防ぐと考えたからである。次の図にトリプトファンの2つの化学修飾法を示そ



う。

一つは、トリプトファンをキヌレニンに変換する方法で、図から明らかなようにキヌレニンが分子内で水素結合（点線）を作るとその形状は2つの6員環構造になり、インドール環と類似した形となる。したがって、蛋白質の構造や機能もそれ程損傷を受けず、元の機能を持つ蛋白質が得られる。すなわち、人工的に天然の蛋白質の兄弟分が作られるわけである。さらによいことは、キヌレニンは普通の蛋白質にない発色団を持ち、その発色団の吸収する光を与えると独特のけい光を出す。この性質を利用すると、pHが変化したり他の物質と結合するなどの外的因子により引き起こされるキヌレニンの周辺環境の変化を、けい光スペクトルの変化として適格に観測することができる。私たちは、この方法を利用して溶菌酵素である卵白リゾチームの62位トリプトファン残基周辺の誘電率を35と決め、この残基が基質分子との結合に関与することを確認することができた。さらに、麹菌の生産するリボ核酸分解酵素であるリボヌクレアーゼ T₁ の活性部位は触媒反応時に微小な可逆的構造変化を示唆する結果も得た。

もう一つの方法は、トリプトファンがトリプトファン*になる反応で、修飾反応ではないとお叱りをうけるかも知れない。たしかにそうではあるが、*印をつけた部位の炭素原子を炭素同位体で置換したのがトリプトファン*なのである。いいかえると、修飾による構造の変化を零に収斂させたもので、いわば兄弟よりなお血縁関係の強い一卵性双生児ともいふべきものである。実際には、天然炭素の99%を占める¹²Cのかわりに90%以上に増強された¹³Cを*印の部位に導入し、それをプローブとして核磁気共鳴法により印付けされたトリプトファンの挙動や局所環境を探るのが目的である。普通、化学的手段で蛋白質分子中の側鎖原子の入れ換えは容易でないが、私たちはインドール環の開環と閉環を温和な条件でできる反応を考案し、つい最近、蛋白質にも適用できることを見出した。そして、前述のリゾチームの62位残基は、数Åも離れた位置にある触媒基の52位ア

スパラギン酸や35位グルタミン酸の側鎖カルボキシル基のプロトンの出入りに伴ってその局所環境が微妙に変化することを明らかにした。

この方法は、天然の蛋白質そのものを研究対象にして印付けされたトリプトファンに限定した検討ができるのが特長である。また、この印付け法には ^{14}C や ^3H も使用できるので蛋白質の放射性同位元素による標識にも利用できる。

現在のところ、私たちの研究もその方法論を確立した段階で多種の蛋白質に適用するまでに

至っていないが、分子表面に存在して基質との結合に関与するリゾチームの62位トリプトファンや触媒基に隣接した分子内部で活性部位の構造を支えるリボヌクレアーゼ T_1 の59位トリプトファンについて行った研究からは、このアミノ酸の側鎖の形状と疎水的性質がこれらの酵素蛋白質の機能の発現に重要であることが明らかになった。今後は、さらに、トリプトファンの電子豊かな特性が蛋白質の機能にどのように寄与しているのか明らかにしたいと願っている。

